

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 21720091152140

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

4 株海洋微生物次级代谢产物的研究

Studies on the Secondary Metabolites of Four Marine
Microorganisms

宋龙凤

指导教师姓名: 宋思扬 教 授

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2012 年 月 日

论文答辩时间: 2012 年 月 日

学位授予日期: 2012 年 月 日

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

厦门大学博士论文摘要库

目录	
常用英文缩写词	I
摘 要	II
Abstract	IV
1 前 言	1
1.1 引言	1
1.1.1 天然产物是药物的重要来源	1
1.1.2 微生物是天然产物的重要来源	2
1.2 植物内生菌及其次级代谢产物的研究概况	3
1.2.1 植物内生菌的定义及其多样性	3
1.2.2 植物内生放线菌活性次级代谢产物研究概况	4
1.2.3 植物内生真菌活性次级代谢产物的研究概况	9
1.3 海洋放线菌的研究概况	11
1.3.1 海洋放线菌的分布	11
1.3.2 海洋放线菌物种资源及生物多样性	12
1.3.3 海洋放线菌次级代谢产物的研究	14
1.4 本课题的研究内容、目的和意义	20
2 材料与amp;方法	24
2.1 材料	24
2.1.1 菌株来源	24
2.1.2 抗菌活性测定指示菌	24
2.1.3 肿瘤细胞株	24
2.1.4 药品与试剂	24
2.1.5 仪器	25
2.1.6 常用培养基	26
2.1.7 抗肿瘤活性测试常用试剂	27
2.1.8 TLC 显色剂	27
2.2 方法	27
2.2.1 技术路线	27

2.2.2 培养基的筛选.....	28
2.2.3 化合物分离纯化的方法.....	28
2.2.4 化合物结构鉴定.....	30
2.2.5 化合物生物活性测定方法.....	31
3 结果分析.....	33
3.1 植物内生真菌 <i>Phomopsis</i> sp. A818 的次级代谢产物分离和结构解析.....	33
3.1.1 <i>Phomopsis</i> sp. A818 的背景介绍.....	33
3.1.2 菌株发酵及发酵产物提取.....	33
3.1.3 发酵产物的分离纯化.....	33
3.1.4 化合物的结构解析.....	35
3.2 放线菌 <i>Streptomyces</i> sp. LZ38 的次级代谢产物分离和结构解析.....	49
3.2.1 海洋放线菌 <i>Streptomyces</i> sp. LZ38 的背景介绍.....	49
3.2.2 菌株发酵及发酵产物提取.....	49
3.2.3 发酵产物的分离纯化.....	50
3.2.4 化合物的结构解析.....	51
3.3 放线菌 <i>Micromonospora</i> sp. HK161022 的次级代谢产物分离和结构解析.....	61
3.3.1 放线菌 <i>Micromonospora</i> sp. HK161022 的背景介绍.....	61
3.3.2 菌株发酵及发酵产物提取.....	61
3.3.3 发酵产物的分离纯化.....	62
3.3.4 化合物的结构解析.....	64
3.4 海洋链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp. FXY109 的次级代谢产物分离和结构解析.....	73
3.4.1 放线菌 <i>Streptomyces</i> sp. FXY109 的背景介绍.....	73
3.4.2 菌株发酵及发酵产物提取.....	73
3.4.3 发酵产物的分离纯化.....	73
3.4.4 化合物的结构解析.....	75
3.5 化合物的活性.....	81
4 讨论与结论.....	82
4.1 四株海洋微生物次级代谢产物分析.....	82
4.1.1 植物内生真菌 <i>Phomopsis</i> sp. A818 的次级代谢产物分析.....	82
4.1.2 海洋链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp. LZ38 次级代谢产物分析.....	83
4.1.3 海洋小单孢菌 <i>Micromonospora</i> sp. HK161022 次级代谢产物分析.....	83

4.1.4 海洋链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp. FXY109 次级代谢产物分析	84
4.2 AHBA 合酶基因阳性菌株与安莎类抗生素筛选	85
4.3 展望	85
参考文献	88
附录	97
致 谢	99

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENT

ABBREVIATIONS	II
ABSTRACT IN CHINESE	II
Abstract.....	IV
1 INTRODUCTION	1
1.1 FOREWORD.....	1
1.1.1 Natural products is an important source of medicines.....	1
1.1.2 Microorganism is an important source of medicines.....	2
1.2 The Endophyte and its secondary products	3
1.2.1 The definition and the diversity of Endophyte	3
1.2.2 Study on the activity compounds of the Endophyte actinomycetes.....	4
1.2.3 Study on the active metabolites of the Endophyte	9
1.3 The marine actinomycetes and its secondary products.....	11
1.3.1 The distribution of the marine actinomycetes.....	11
1.3.2 The diversity of the marine actinomycetes	12
1.3.3 Study on the secondary of marine actinomycetes.....	14
1.4 Purpose, significance and contents of this thesis.....	20
2 MATERIALS AND METHODS	24
2.1 Materilas	24
2.1.1 Soure of the strains.....	24
2.1.2 Indicator organisms of antimicrobial assays.....	24
2.1.3 Tumor cell lines	24
2.1.4 Main reagents and disposable materials	24
2.1.5 Main instruments	25
2.1.6 Culture media.....	26
2.1.7 Reagents used in bioassays	26
2.1.8 TLC chromogenic reagents.....	27
2.2 Methods.....	27
2.2.1 Experimental procedures	27
2.2.2 Medium screening.....	28

2.2.3	Methods of isolation	28
2.2.4	The structure elucidations	30
2.2.5	Testing for the bioactivities of compounds	31
3	RESULTS AND ANALYSIS	33
3.1	Study of secondary metabolites from strain <i>Phomopsis</i> sp. A818.....	33
3.1.1	The background of <i>Phomopsis</i> sp. A818	33
3.1.2	The fermentation and extraction	33
3.1.3	The isolation elucidations	33
3.1.4	The structure elucidations	35
3.2	Study of secondary metabolites from strain <i>Streptomyces</i> sp. LZ38	49
3.2.1	The background of <i>Streptomyces</i> sp. LZ38.....	49
3.2.2	The fermentation and extraction	49
3.2.3	The isolation elucidations	50
3.2.4	The structure elucidations	51
3.3	Study of secondary metabolites from strain <i>Micromonospora</i> sp. HK161022	61
3.3.1	The background of <i>Micromonospora</i> sp. HK161022	61
3.3.2	The fermentation and extraction	61
3.3.3	The isolation elucidations	62
3.3.4	The structure elucidations	64
3.4	Study of secondary metabolites from strain <i>Streptomyces</i> sp. FXY109....	73
3.4.1	The background of <i>Streptomyces</i> sp. FXY109	73
3.4.2	The fermentation and extraction	73
3.4.3	The isolation elucidations	73
3.4.4	The structure elucidations	75
3.5	The antitumor activity of compounds	错误！未定义书签。
4	DISCUSSION AND CONCLUSION	82
4.1	Discussion of the compounds from four strains	82
4.1.1	Compounds from <i>Phomopsis</i> sp. A818.....	83
4.1.2	Compounds from <i>Streptomyces</i> sp. LZ38.....	84
4.1.3	Compounds from <i>Micromonospora</i> sp. HK161022.....	85

4.1.4 Compounds from <i>Streptomyces</i> sp. FXY109.....	85
4.2 Gene for AHBA synthetase and screening of ansamycins.....	86
4.3 Expectation.....	错
误！未定义书签。	
REFERENCES.....	88
APPENDIXS.....	97
ACKNOWLEDGEMENTS	99

厦门大学博硕士论文摘要库

常用英文缩写词

缩写式	全称
NMR	Nuclear magnetic resonance (核磁共振)
MS	Mass spectrometry
UV	Ultraviolet (紫外)
ESI-MS	Electrospray ionization mass spectrometry
δ	chemical shift (化学位移)
s	singlet (单重峰)
d	doublet (二重峰)
t	triplet (三重峰)
q	quartet (四重峰)
dd	doublet of doublet
dt	doublet of triplet
m	Multiplet (多重峰)
DEPT	distortionless enhancement by polarlization transfer
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation (碳氢远程相关)
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence (异核多量子相关)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence (异核相关)
COSY	Correlated spectroscopy
R_f	Relative mobility
RP-18	Reversed-phase octadecyl silica gel
TLC	Thin layer chromatography
IC ₅₀	concentration giving 50% of maximal inhibition (半数抑制浓度)
MTT	Methyl Thiazolytetrazolium (甲基四唑蓝)
PBS	phosphate-buffered saline(磷酸缓冲液)
SDS	Sodium dodecyl sulfonate (十二烷基磺酸钠)
s/tube	second per tube
s/d	second per drop

摘 要

寻找具有生物活性新天然产物是发现新药先导化合物的主要途径,许多临床常用的药物均来自于微生物次级代谢产物。微生物活性次级代谢产物主要由放线菌产生,其次就是真菌。海洋微生物能够产生种类繁多、结构新颖、活性多样的次级代谢产物,已成为发现新药先导化合物的重要来源。

本论文对 1 株海洋真菌和 3 株海洋放线菌的次级代谢产物进行了研究,共分离鉴定了 28 个化合物的结构,其中 6 个新化合物。

从海洋植物内生真菌 *Phomopsis* sp. A818 固体 YMG 培养基发酵提取物中共分离鉴定了 11 个化合物的结构,其中有 4 个真菌环氧二烯类化合物(**DAM**, **MED**, **SLF23**, **SLF25**), 3 个十元内酯类化合物(**SLF24**, **SLF27**, **SLF28**), 3 个酚苯甲酸类化合物(**SLF12**, **SLF13**, **SLF16**)和 1 个茛类化合物(**SLF05**), 其中化合物 **SLF05**, **SLF12**, **SLF13**, **SLF16** 和 **SLF23** 是新化合物。

从海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. LZ38 固体 YMG 和固体改良高氏培养基发酵提取物中分离鉴定了 5 个化合物,包括 2 个安莎霉素类化合物(**QY-4**, **QY-6**), 1 个环烯酸(**XX-07**), 1 个二重内酯类化合物(**XX-ZB**)和 1 个聚醚类化合物(**XX-HA**)。

从海洋小单孢菌 *Micromonospora* sp. HK161022 固体 YMG 培养基和液体 YMG 培养基发酵提取物中分离鉴定了 7 个化合物,包括 2 个吡咯类化合物(**HK01**, **HK07**), 1 个呋喃类化合物 (**HK02**), 1 个甲氧基色烯类化合物 (**HK03**), 1 个尼古酸 (**HK06**), 1 个吡喃类化合物(**HK09**)和 1 个环二肽(**HKHK-1a**), 其中化合物 **HK09** 为新化合物。

从海洋链霉菌 *Streptomyces* sp. FXY109 液体 Waksman 培养基发酵提取物中分离鉴定了 5 个化合物,包括 1 个吡啶类化合物 (**109 WD12c**), 2 个喹啉类化合物 (**109WE7C2**, **109NE52**), 1 个四氢呋喃二醇 (**109NA7**)和 1 个苯乙酸丙酯类化合物 (**109NA23**)。

采用滤纸片法对部分化合物的抑菌活性进行了初步测定,结果显示:在浓度

为 50 μg /片时化合物 **XX-HA** 对短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus* CMCC63202)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* CMCC63501)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* CMCC28001) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CMCC26003) 的抑菌圈直径分别为 9、16、15 和 18 mm。

采用 MTT 法对部分化合物抗肿瘤活性进行了初步测定, 结果显示: 在终浓度为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 浓度下, 化合物 **SLF25** 对 MDA-MB-435 细胞表现出微弱的抑制活性, 抑制率为 33.94%; 在终浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下, 化合物 **SLF23** 对 MDA-MB-435 细胞的抑制率为 12.24%; 化合物 **MED** 和化合物 **DAM** 对 MDA-MB-435 细胞的 IC_{50} 分别为 7.85 $\mu\text{mol/mL}$ 和 14.6 $\mu\text{mol/mL}$, 具有较强的细胞毒性。

关键词: 海洋放线菌; 海洋真菌; 次级代谢产物

Abstract

Searching new bioactive natural products is still the main way of discovering new drugs. Many important clinical medicines are obtained from microbial secondary metabolites. Most of the microbial bioactive secondary metabolites are produced by actinomycetes, followed by fungi. The marine microorganisms can produce numerous metabolites that have novel and varied skeletons and unique bioactivities which makes them be a very important source for searching new bioactive natural products.

In this thesis, secondary metabolites from one marine fungus and three marine actinomycetes were observed for the discovery of new bioactive compounds. There were 28 compounds were isolated and elucidated from these four strains, including 6 new compounds.

The secondary metabolites of the strain *Phomopsis* sp. A818 for YMG agar medium solid fermentations were studied. Eleven compounds were elucidated by spectroscopic methods, including four Epoxy two of alkenes(**DAM**, **MED**, **SLF23**, **SLF25**), three ten-membered lactones(**SLF24**, **SLF27**, **SLF28**), three Benzoic acids(**SLF12**, **SLF13**, **SLF16**) and one ferrocenylmethyl-substituted indenes compounds(**SLF05**). Compounds **SLF05**, **SLF12**, **SLF13**, **SLF16** and **SLF23** were five new ones.

The secondary metabolites of the strain *Streptomyces* sp. LZ38 for YMG agar medium and G1 agar medium solid fermentations were studied. Five compounds were obtained, including two ansamycins (**QY-4**, **QY-6**), one ring acid (**XX-07**), one two re-lactones (**XX-ZB**) and one polyether (**XX-HA**).

The secondary metabolites of the strain *Micromonospora* sp. HK161022 for YMG agar medium solid and YMG medium liquid fermentations were studied. Seven

compounds were isolated, including two pyrrolic nitrogens (**HK01**, **HK07**), one furan compound (**HK02**), one color vinyl compound (**HK03**), one nicholas (**HK06**), one pyrano compound (**HK09**) and one cyclic peptide (**HKHK-1a**). Compounds **HK09** was a new one.

The secondary metabolites of the strain *Streptomyces* sp. FXY109 for Waksman medium liquid fermentations were studied. Five compounds were isolated, including one indole (**109 WD12c**), two quinazolinone morpholine compounds (**109WE7C2**, **109NE52**), one THF-diol(**109NA7**) and one ester (**109NA23**).

The antimicrobial activity of several compounds was respectively assayed by paper disk method. Results showed that compound **XX-HA** can inhibit the growth of *Bacillus pumilus* CMCC63202, *Bacillus subtilis* CMCC63501, *Micrococcus luteus* CMCC28001 and *Staphylococcus aureus* CMCC26003.

The antitumor activity in vitro of several compounds was respectively assayed by MTT method. Results showed that compound **SLF25** displayed an inhibition rate of 33.94% to the growth of MDA-MB-435 cell line at the final concentration of 50 $\mu\text{mol/mL}$; compound **SLF23** displayed an inhibition rate of 12.24% to the growth of MDA-MB-435 cell line at the final concentration of 500 $\mu\text{mol/mL}$; And the IC_{50} of compound **MED** and **DAM** was 7.85 $\mu\text{mol/mL}$ and 14.6 $\mu\text{mol/mL}$ respectively.

Key words: Marine actinomycetes; Marine fungi; Secondary metabolite

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库